

ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE *CAYAPONIA TAYUYA* EM CÉLULAS DE MELANOMA¹

CITOTOXIC ACTIVITY OF CAYAPONIA TAYUYA EXTRACTS IN MELANOMA CELLS

Bruna Felice Jimenez², Julien Wergutz³ e Luciana Maria Fontanari Krause⁴

RESUMO

Cayaponia tayuya é uma planta da família Cucurbitaceae originária da região amazônica, conhecida pela atividade anti-inflamatória e antitumoral de seus extratos. O melanoma é o mais grave tipo de câncer de pele, sendo a região Sul do Brasil a mais afetada, estimando-se em média 970 novos casos por ano. Este estudo visou avaliar a atividade citotóxica de extratos de *C. tayuya*, obtidos por extração com solventes de diferentes polaridades, sobre a linhagem tumoral de melanoma murino B16F10. As células foram cultivadas em estufa de CO₂ e tratadas com diferentes concentrações dos extratos (500-3000 µg/mL) e a citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular utilizando brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio e pela determinação da liberação de lactato desidrogenase. Os extratos éter etílico e butílico foram tóxicos nas menores concentrações (500 µg/ml) e reduziram para menos de 5% a viabilidade celular na maior concentração (3000 µg/ml). Estes resultados indicam a atividade citotóxica de extratos de *C. tayuya*, sugerindo o seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: antitumoral, cucurbitacinas, flavonoides, neoplasia, produtos naturais.

ABSTRACT

Cayaponia tayuya is a plant found in the amazonic region and belongs to the Cucurbitaceae's family. This plant is known by its extracts' anti-inflammatory and antitumorous activities. Melanoma is the most dangerous skin cancer, with higher incidence in the South of Brazil causing about 970 new cases per year. This project aimed the evaluation of the antitumoral activity of *C. tayuya* extracts obtained by the extraction by solvents with different polarity on B16F10 murine melanoma cell lines. The cells were cultivated in incubators with 5% CO₂ and treated with plants extracts in the concentrations of 500 to 3000 µg/mL. The cell viability was analyzed using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide and lactate dehydrogenase production. The ethyl ether, ethyl acetate and butanol extracts were toxic to the cells in the smallest concentration (500 µg/mL) and reduced the cell viability to less than 5% at the highest concentration (3000 µg / mL). These results indicate a cytotoxic activity of *C. tayuya*, suggesting a therapeutical potential.

Keywords: antitumorous, cucurbitacins, flavones, neoplasia, natural products.

¹Trabalho Final de Graduação - TFG.

²Acadêmica do curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano. E-mail: brunafelice@hotmail.com

³Coautor. Acadêmico do curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano. E-mail: wergutz@hotmail.com

⁴Orientadora. Docente no Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida - Centro Universitário Franciscano. E-mail: lfontanari@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Cayaponia tayuya é uma planta da família Cucurbitaceae, originária da região amazônica da América do Sul. Ela é muito conhecida por seus princípios ativos, dado que estudos comprovam suas diversas atividades medicinais. Essa planta foi primeiramente registrada na farmacopeia brasileira como uma “droga herbácea” no ano de 1929; e na composição de sua raiz já se evidenciava a presença de flavonoides, cucurbitacinas e glicosídeos *nor*-cucurbitáceos (BAUER et al., 1985).

Os cayaponosídeos descritos na *Cayaponia cayuya* são os cayaponosídeos A, B, C, D e suas frações (HIMENO et al., 1994). Apesar de sua estrutura ser detalhadamente estudada, ainda não se tem clara a atividade biológica desses compostos. Os extratos flavonoides da planta, assim como as cucurbitacinas, apresentam atividade anti-inflamatória bastante importante. Em relação aos flavonoides, estes agem inibindo a indução das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e da ciclooxigenase 2 (COX-2) enquanto a atividade anti-inflamatória das cucurbitacinas, em sua maioria a 23,24-dihydrocucurbitacina B e a cucurbitacina R, acontece devido a inibição de enzimas e mediadores pró-inflamatórios (ESCANDELL et al., 2006; AQUILA et al., 2009).

Além de sua comprovada atividade anti-inflamatória, os flavonoides e as cucurbitacinas são potenciais agentes antitumorais. Os flavonoides extraídos da espécie (swertisina, espinosina, orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e vicenina-2) apresentam atividade antitumoral frente a diversas linhagens celulares. Apesar de algumas variações de acordo com o tipo de flavonoide e a linhagem tumoral, em geral, os extratos são capazes de causar uma desregulação na expressão dos genes da ciclina D, E, CDK2, Bcl-2, Bax e das caspases 3 e 9. Assim, o mecanismo de ação destes é pela indução de apoptose devido à detenção das células tumorais na fase G1 e G2/M do ciclo celular. Além disso, algumas frações são capazes de ativar a via AMPK em linhagens celulares de câncer de pâncreas, bem como a ativação da via JNK MAPK em células de carcinoma hepatocelular (NAGAPRASHANTHA et al., 2011; LEE et al., 2012; LIN et al., 2016).

Em relação às cucurbitacinas presentes na *C. tayuya* (cucurbitacina R, cucurbitacina R-glicosilada, cucurbitacina B, cucurbitacina B-glicosilada, 23,24-dihydrocucurbitacina B, 23,24-dihydrocucurbitacina B-glicosilada e 23,24-dihydroisocucurbitacina B), pode-se dizer que são os compostos com mais potente atividade antitumoral desta espécie, apresentando diversos mecanismos de indução de morte celular frente a diversas linhagens celulares. No entanto, cabe ressaltar que a cucurbitacina R-glicosilada, a 23,24-dihydrocucurbitacina B-glicosilada e a 23,24-dihydroisocucurbitacina B ainda não possuem atividade antiproliferativa evidenciada (BARTALIS; HALAWEISH, 2005; ALGHASHAM, 2013). Segundo Sun et al. (2005), a atividade antiproliferativa das cucurbitacinas se dá, principalmente, por sua capacidade de inibir a via de sinalização JAK/STAT3 em tipos de cânceres que a apresentam de forma ativa. Diversas cucurbitacinas são capazes de impedir a fosforilação dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs), impedindo assim sua manifestação.

O melanoma é um tipo de câncer que se origina nos melanócitos, células produtoras de melânica, responsáveis pela pigmentação. Ele atinge mais numerosamente a população adulta jovem, devido ao grau de exposição solar, além de ser mais comum em pessoas de pele clara e raramente depende de predisposição genética para se desenvolver (PULIDO, 2007). É um tipo de câncer com baixa incidência, com expectativa de 3 mil casos novos em homens e 2.670 casos novos em mulheres, porém com alta letalidade. Acredita-se que a frequência do melanoma tenha triplicado mundialmente nos últimos 20 anos.

Apesar da apresentação de diversas abordagens ante aos diferentes estágios do melanoma, ainda há dificuldade em obter um tratamento eficaz com um reduzido número de efeitos adversos. Dessa forma, gradativamente, existe uma procura de fármacos mais efetivos no combate ao câncer com grande número de produtos oriundos de fontes naturais (CHAPMAN et al., 2011).

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade citotóxica das frações do extrato de *C. tayuya* frente à linhagem de melanoma B16F10.

MATERIAL E MÉTODOS

EXTRAÇÃO DA ESPÉCIE *CAYAPONIA TAYUYA*

A planta, já seca, passou por um processo de extração conforme descrito por Hoelzel et al. (2005), com algumas modificações. Raízes secas pulverizadas foram exaustivamente extraídas com metanol (MeOH) a temperatura ambiente. O extrato metanólico resultante foi filtrado e fracionado com éter etílico (Et₂O), acetato de etila (EtOAc), éter etílico (Et₂O), n-butanol e clorofórmio (CHCl₃) para obter as respectivas frações.

O material vegetal previamente preparado, como acima descrito, foi gentilmente cedido pela Professora Solange Silva e, por isso, para esse trabalho, não foi realizada a confirmação da espécie e a determinação para a verificação dos seus constituintes.

CULTURA DE CÉLULAS B16F10

A linhagem celular B16F10 foi cultivada em garrafas de cultura estéreis contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% dos antibióticos penicilina/estreptomicina, a 37 °C em incubadora com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

O meio de cultura foi substituído de um a dois dias de acordo com o metabolismo celular. Antes de atingirem a confluência (70 a 80% de sua densidade de saturação), as células foram repicadas, ressuspensas e, então, transferidas para novos frascos de cultivo celular. Os estoques celulares foram mantidos em criotubos contendo meio de cultura, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e SFB,

armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade sugeridos pelo Banco de Linhagens Celulares (ATCC).

ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR COM AZUL DE TRIPAN

Após as células atingirem a confluência, essas foram tratadas com tripsina-EDTA 0,05% para promover o seu descolamento das placas e lavadas duas vezes com solução de PBS (Phosphate Buffered Saline). Em seguida, foram transferidas para um tubo falcon com meio de cultura e submetidas à centrifugação por 10 minutos a 200g. O sobrenadante foi desprezado e os pellets ressuspensos em meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB.

Foram transferidos 50 μL da suspensão de células e 50 μL de azul tripan para um ependorff e homogeneizados. Em seguida, 15 μL desta mistura foram transferidos para a superfície da câmara de Neubauer. O reagente azul de tripan é utilizado na análise da viabilidade celular por meio da contagem das células em câmara de Neubauer. Nas células vivas o reagente não penetra, permanecendo descoradas. Porém, quando ocorre a morte celular, a membrana celular é lesada e o reagente entra no citoplasma celular, corando as células de azul. A proporção entre as células vivas e mortas (total de células) indica a porcentagem da viabilidade celular (GORJÃO, 2005).

Para a contagem do número de células viáveis na câmara de Neubauer foi utilizado um microscópio óptico (Nikon) com aumento de 200 vezes. O número de células utilizadas nos experimentos foi de 1×10^5 células por poço.

GRUPOS DE TRATAMENTOS DAS CÉLULAS

Os tratamentos foram realizados em placas de 96 poços, em triplicata, com os seguintes grupos: A) grupo controle positivo, contendo apenas meio de cultura e células; B) grupos de tratamentos com as frações clorofórmica, acetato de etila, butanóica e éter etílico nas concentrações de 3000, 2500, 2000, 1500, 1000 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C) grupo controle negativo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Os testes foram realizados em períodos de 24 horas após os tratamentos.

ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO BROMETO DE 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL TETRAZÓLIO (MTT)

Esse teste baseia-se na redução do MTT em formazan, pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase.

Após 24 h de tratamento, cada poço foi tratado com MTT e as placas mantidas por 4 horas em estufa de CO_2 . As células viáveis são capazes de reduzir o MTT a formazan, formando cristais

com cor violeta, solúveis em dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura foi feita a 570 nanômetros (nm), utilizando um leitor de microplacas ELISA. Cada teste foi efetuado em triplicata. A porcentagem de sobrevivência celular foi calculada para cada extrato utilizando o GraphPad Prizm 5.

AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

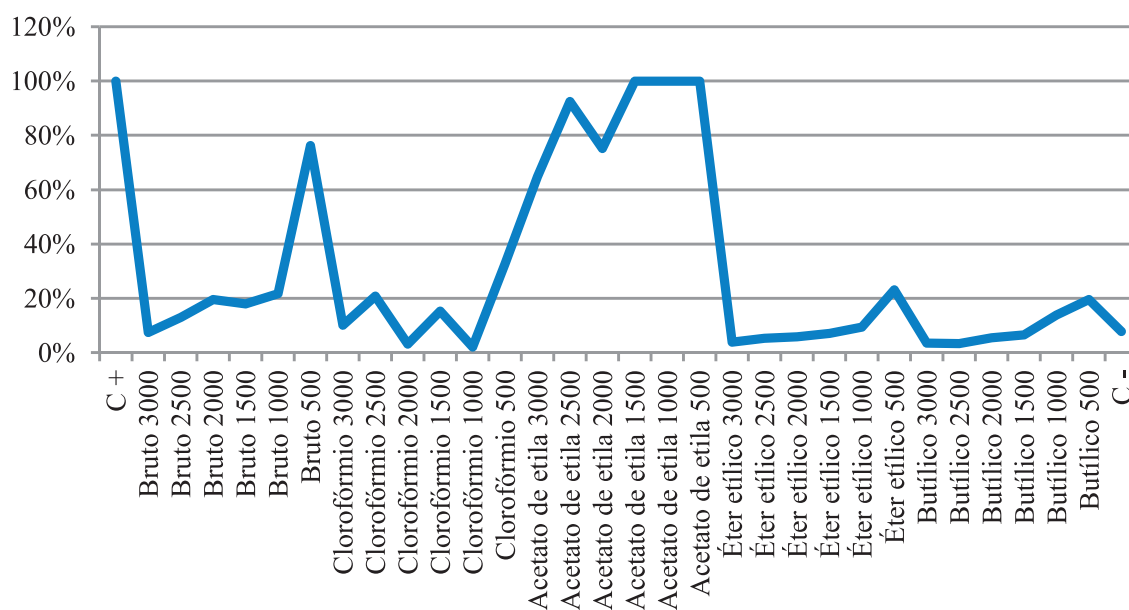
O método utilizado para a determinação de LDH foi o cinético (piruvato-lactato UV 37°C). A desidrogenase láctica catalisa a reação do lactato a piruvato na presença de NADH, que reduz estequiometricamente o piruvato em um complexo de cor vermelha. A leitura foi realizada em λ 500 nm e o resultado expresso em U/L. A LDH foi determinada através de Kit adquirido comercialmente e a técnica seguiu as instruções do fabricante (Kit CytoTox 96).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de viabilidade celular foram conduzidos com linhagens celulares de melanoma B16F10, em uma concentração de 1×10^5 células por poço. Os tratamentos foram realizados em triplicata e a viabilidade celular foi determinada utilizando o (MTT), após 24 h dos tratamentos. O grupo controle, contendo apenas meio de cultura e células, foi considerado como tendo 100% de viabilidade celular. A partir desse, foi calculada a porcentagem de viabilidade celular dos grupos tratados, conforme o gráfico (Figura 1).

Figura 1 - Gráfico representativo da viabilidade celular resultante do experimento de MTT de 24 horas com os diferentes tratamentos. Eixo x - tratamentos; eixo y - viabilidade celular em porcentagens.



De acordo com o gráfico acima, pode-se inferir que a viabilidade celular diminui à medida que as concentrações dos tratamentos aumentam. Notavelmente, na menor concentração (500 µg/mL), os extratos brutos, clorofórmio, éter etílico e butílico diminuíram pelo menos a 80% a viabilidade celular em relação ao grupo controle. Já na maior concentração (3000 µg/mL), estes mesmos extratos foram capazes de diminuir em no mínimo 10% a viabilidade celular.

Além disso, pode-se observar que os extratos que apresentaram maior efetividade frente às células tumorais foram a fração de clorofórmio, éter etílico e butílico, os quais, pela descrição da literatura, são majoritariamente compostos por cucurbitacinas e flavonoides.

As cucurbitacinas são reconhecidas pelo seu potencial antitumoral, sendo este efeito relacionado a diferentes mecanismos, entre eles, a disrupção do esqueleto de actina das células, inibição de fatores de crescimento, desregulação da via de sinalização STAT3, entre outros, variando conforme o tipo de cucurbitacina (RECIO et al., 2004; SUN et al., 2005; ESCANDELL et al., 2006).

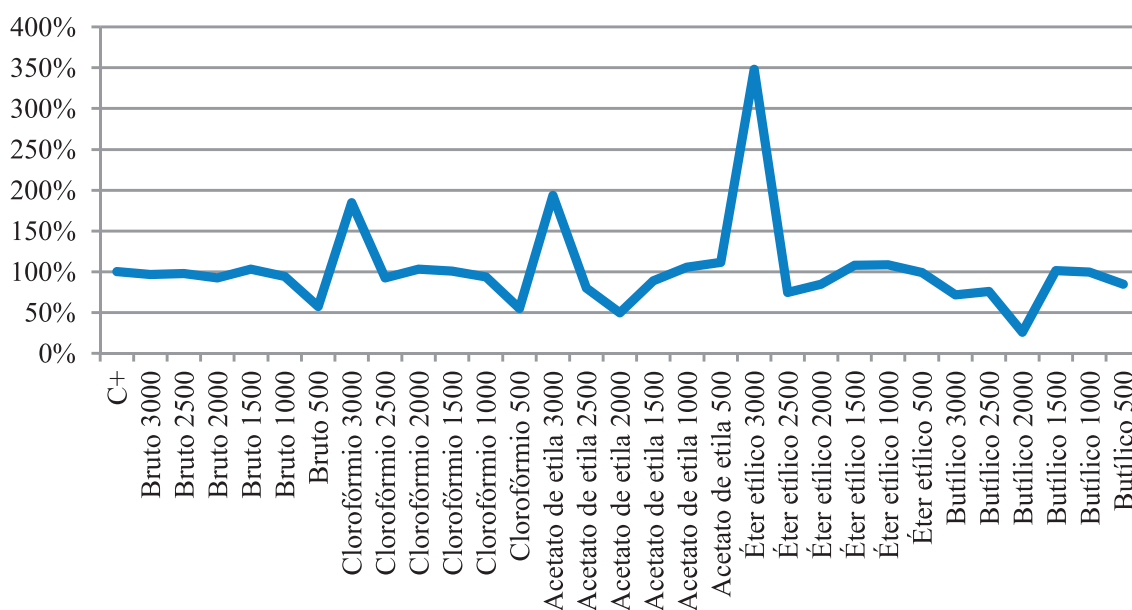
Os compostos flavonoides, por sua vez, apesar de algumas variações de acordo com o tipo de flavonoide e a linhagem tumoral, são considerados agentes antitumorais por causar uma desregulação na expressão dos genes da ciclina D, E, CDK2, Bcl-2, Bax e das caspases 3 e 9 e indução da apoptose.

Além disso, algumas frações são capazes de ativar a via AMPK em linhagens celulares de câncer de pâncreas, bem como a ativação da via JNK MAPK em células de carcinoma hepatocelular (NAGAPRASHANTHA et al., 2011; LEE et al., 2012; LIN et al., 2016).

AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A avaliação da liberação da LDH foi realizada por um método cinético, com concentração celular de 1×10^5 células por poço. A presença da enzima lactato desidrogenase no meio extracelular significa que a célula foi lisada, havendo sua liberação. Dessa forma, os grupos de tratamentos em que a quantidade de enzima no meio extracelular foi significativamente superior àquela do grupo controle com as frações clorofórmica, acetato de etila e éter etílico, indicando que estes causaram a lise celular apenas em suas maiores concentrações, como expresso no gráfico (Figura 2). Além disso, percebe-se um pico de liberação de LDH pelas células tratadas pelo extrato de éter etílico na sua maior concentração (3000 µg/ml), levando a acreditar que o extrato apresenta substâncias com propriedades citolíticas.

Figura 2 - Gráfico representativo do resultado de avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Eixo x - quantidades da enzima em porcentagens; eixo y - diferentes tratamentos das células em cultura.



CONCLUSÃO

Os tratamentos realizados com a planta bruta, em diferentes concentrações, apresentaram-se significativamente tóxicos às células B16F10. Os extratos éter etílico, acetato de etila e butílico foram capazes de reduzir a viabilidade celular mesmo em baixas concentrações; o extrato acetato de etila, além de reduzir a viabilidade celular, aumentou a liberação da enzima lactato desidrogenase no meio extracelular, indicando que causou lise das células; já o extrato éter etílico diminuiu a viabilidade celular e aumentou a liberação de LDH.

A capacidade dos extratos da *C. tayuya* de causar tais danos celulares se dá, possivelmente, devido à presença e conservação dos compostos cayaponosídeos, flavonoides e cucurbitáceos da planta em cada extrato.

REFERÊNCIAS

ALGHASHAM, A. A. Cucurbitacins - a promising target for cancer therapy. **International Journal of Health Sciences**, v. 7, n. 1, p. 77-89, 2013.

AQUILA, S. et al. Antiinflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 333-337, 2009.

BARTALIS, J.; HALAWEISH, F. T. Relationship between cucurbitacins reversed-phase high-performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 818, n. 2, p. 159-166, 2005.

BAUER, R. et al. Cucurbitacins and flavone C glycosides from *Cayaponia tayuya*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 24, 1985.

CHAPMAN, P. B. et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **The new england journal of medicine**, Inglaterra, v. 364, n. 26, p. 2507-2516, 2011.

ESCANDELL, J. M. et al. Dihydrocucurbitacin B, isolated from *Cayaponia tayuya*, reduces damage in adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 532, n. 1-2, p. 145-154, 2006.

GORJÃO, R. Contagem de Células. In: PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap. 5, p. 22-24.

HIMENO, E. et al. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (VELL.) COGN.I. Structures of cayaponosides, new 29-nor-1,2,3,4,5 10-hexadehydrocucurbitacin glucosides. **Chem Pharm Bull**, v. 42, n. 11, p. 2295-2300, 1994.

HOELZEL, S. C. S. M. et al. An unusual quinolinone alkaloid from *Waltheria douradinha*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1163-1167, 2005.

LEE, C. Y. et al. Apoptosis triggered by vitexin in U937 human leukemia cells via a mitochondrial signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 28, n. 5, p. 1883-1888, 2012.

LIN, X. et al. Isoorientin from *Gypsophila elegans* induces apoptosis in liver cancer cells via mitochondrial-mediated pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 187-194, 2016.

NAGAPRASHANTHA, L. D. et al. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 9, p. 1100-1109, 2011.

PULIDO, J. Z. Melanoma Maligno. **Rev. Bras. Oncologia Clínica**, v. 4, n. 11, p. 25-29, 2007.

RECIO, M. C. et al. Anti-inflammation activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. **Planta Medica**, v. 70, n. 5, p. 414-20, 2004.

SUN, J. et al. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. **Oncogene**, v. 24, p. 3236-3245, 2005.

